

12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22) Date de dépôt : 30 septembre 1982.

30) Priorité

71) Demandeur(s) : AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RECHERCHE (ANVAR), établissement public.  
— FR.

72) Inventeur(s) : Françoise Audibert, Grzegorz Przewlocki, Pierre Lefrancier, Jean Choay et Louis Chedid.

43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 14 du 6 avril 1984.

60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

73) Titulaire(s) :

74) Mandataire(s) : Plasseraud.

54) Composition possédant des propriétés immunorégulatrices, notamment d'adjuvants immunologiques non spécifiques, à base de muramylpeptide et d'un dérivé d'aluminium.

57) L'invention concerne une composition présentant des propriétés adjuvantes, renforçant l'activité immunoprotectrice d'agents immunogènes, naturels ou synthétiques. Elle est constituée par une association d'un dérivé d'aluminium ayant lui-même des propriétés adjuvantes, notamment l'hydroxyde d'aluminium, et d'un muramyl-peptide adjuvant, notamment l'ester  $\alpha$ -n-butylique de la N-acétyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamine.

Composition possédant des propriétés immuno-régulatrices, notamment d'adjuvants immunologiques non spécifiques, à base de muramyl-peptide et d'un dérivé d'aluminium.

L'invention concerne une composition possédant des propriétés immunorégulatrices, notamment d'adjuvants immunologiques non spécifiques, ces compositions étant plus particulièrement aptes à renforcer l'activité immuno-protectrice d'agents immunogènes, naturels ou synthétiques.

- Plus particulièrement encore, l'invention concerne des compositions aptes à être utilisées chaque fois que l'on recherche un renforcement ou une stimulation de la réponse immunitaire susceptible d'être induite chez l'homme ou l'animal par un principe actif de vaccin, soit que celui-ci soit un immunogène faible par nature, soit qu'il soit fort mais ne puisse être utilisé qu'à très faibles doses, soit encore que son caractère immunogène ait été amoindri du fait de purifications poussées dans le but d'en réduire les effets secondaires indésirables. Parmi ces derniers principes actifs de vaccin, on peut mentionner l'antigène de surface HBs, dont est connue la capacité d'induire la production *in vivo* d'anticorps protecteurs actifs contre le virus de l'hépatite virale B. Le vaccin constitué par l'antigène de surface HBs est non seulement peu immunogène, mais encore disponible en faible quantité seulement.

Il existe de nombreux composés connus comme présentant des qualités adjuvantes. On mentionnera en premier lieu les dérivés appartenant aux catégories de composés désormais connus sous l'expression "muramyl-peptides", lesquels comportent en général un groupe glucosidique dérivé de l'acide N-acétyl-muramique ou d'homologues de celui-ci, du fait de la substitution de certains des radicaux entrant dans la constitution du groupe muramyle par d'autres, ce groupe

glucosidique étant lié à une chaîne peptidique, dont le premier résidu aminoacyle est en général dérivé d'un amino-acide naturel, le plus souvent un résidu L-alanyle, et dont le second résidu aminoacyle est en général constitué par  
5 l'acide glutamique, dont l'une ou les deux fonctions carboxyliques peuvent elles-mêmes être substituées.

Parmi ces muramyl-peptides figurent des séries de composés à la fois actifs et pratiquement dépourvus de toute pyrogénicité. A titre d'exemple de ces séries, on mentionne  
10 les dérivés de muramyl-peptides susdits, dans lesquels la fonction  $\alpha$ -carboxyle du résidu glutamyle est substituée par un groupe ester et la fonction  $\gamma$ -carboxyle est substituée par une fonction amide. Des composés particulièrement représentatifs de cette dernière série sont constitués par  
15 l' $\alpha$ -méthyl-ester et l' $\alpha$ -n-butyl-ester de la N-acétyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamine.

D'autres substitutions peuvent encore intervenir sur certaines parties desdits muramyl-peptides. A titre d'exemple, on mentionnera les substitutions sur l'azote du  
20 premier résidu aminoacyle de la chaîne peptidique desdits muramyl-peptides et plus particulièrement encore la N-acétyl-muramyl-L-(N-méthyl-alanyl)-D-isoglutamine.

Les muramyl-peptides définis ci-dessus peuvent être conjugués aux antigènes.

25 Parmi ces muramyl-peptides, il en est donc un certain nombre qui réunissent dans la même molécule un ensemble de qualités, tant sur le plan de l'activité que de celui de l'excellente tolérance de l'hôte, qui en font des adjuvants immunologiques particulièrement choisis.

30 Il peut néanmoins être intéressant, du moins en rapport avec certains agents immunogènes, de disposer de compositions adjuvantes dont les actions puissent être modulées, en durée, en intensité, et ce plus particulièrement en rapport avec des protocoles d'administra-

tion déterminés. A cet égard, on remarquera que certains adjuvants déjà assez anciens sont encore utilisés, par exemple en raison de leur rapidité d'action. Tel est notamment le cas de certains dérivés d'aluminium connus pour exercer un rôle d'adjuvant immunologique à l'égard de principes actifs de vaccin, tels que certains sels d'aluminium ou l'hydroxyde d'aluminium. Ces derniers ne sont cependant pas dépourvus d'effets secondaires, par exemple parce que leur action adjuvante peut se manifester par la production de différents types d'immunoglobulines, telles que celles appartenant à la classe des immunoglobulines E (IgE), qui sont le support de manifestations d'hypersensibilité immédiate susceptibles de résulter en des chocs anaphylactiques, en des réactions d'asthme, de rhume de foin, d'urticaire, etc...

L'invention a pour but de fournir une composition adjuvante particulièrement efficace, mettant en oeuvre des dérivés d'aluminium du type sus-indiqué et en présentant les qualités mais dont les effets secondaires sont susceptibles d'être maîtrisés.

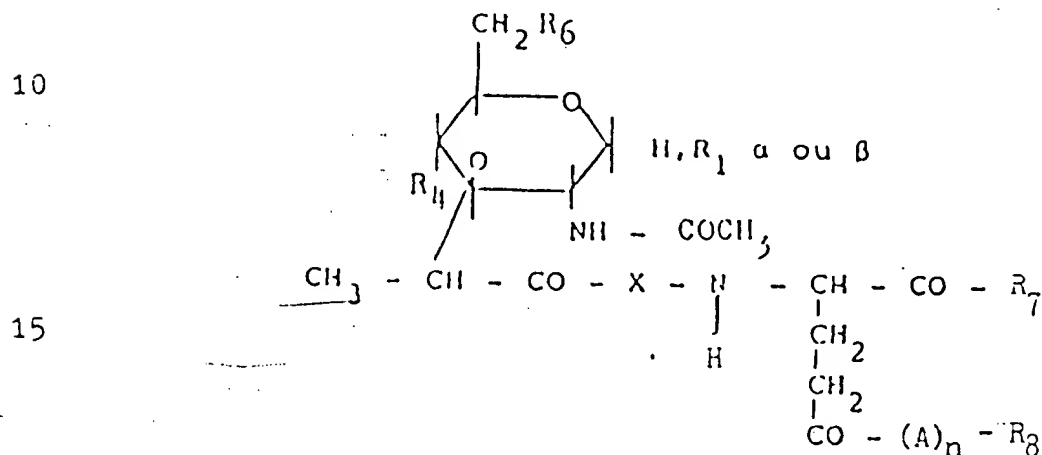
La composition selon l'invention est caractérisée par l'association de tels dérivés d'aluminium, avec au moins un muramyl-peptide, dans des proportions mutuelles permettant l'exaltation de leurs propriétés adjuvantes mutuelles au-delà de l'activité qui résulterait du simple cumul des activités propres de chacun des constituants de ladite composition.

Il a en effet été découvert que l'association avec un tel dérivé d'aluminium d'un muramyl-peptide conduisait à un effet synergique très important au niveau des activités adjuvantes, en l'absence de potentialisation de la production d'immunoglobulines du type IgE, si bien qu'il devient possible d'obtenir des compositions bénéficiant des caractéristiques de rapidité d'action obtenues par des doses beaucoup plus fortes desdits composés d'alumine, tout en maintenant les proportions induites d'IgE, dans

des proportions suffisamment réduites pour que leurs effets secondaires puissent être tenus pour négligeables.

Au titre des dérivés d'aluminium susceptibles d'être utilisés dans les compositions selon l'invention, on mentionnera, outre les hydroxydes d'aluminium, des sels, notamment les phosphates d'aluminium.

Parmi les muramyl-peptides susceptibles d'être mis en oeuvre, on mentionnera en particulier ceux répondant à la formule générale :



dans laquelle les substituants  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_6$ ,  $\text{X}$ ,  $\text{R}_7$ ,  $\text{R}_8$ ,  $\text{A}$  et  $n$  ont respectivement les significations suivantes :

- $\text{R}_1$  est  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NY}$  ou  $-\text{OY}$ ,  $\text{Y}$  représentant un groupe substitué ou non par un groupe amino, ce groupe étant choisi parmi alcoyle, aryle ou alcoyl-aryle portant un maximum de 10 atomes de carbone ;
- $\text{R}_4$  est hydroxyle, acyloxy ou alcoxy ayant au plus 4 atomes de carbone, ou monosuccinyle ;
- $\text{R}_6$  est  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NHZ}$  ou  $-\text{OZ}$ ,  $\text{Z}$  étant un radical linéaire ou ramifié formé par acyle ou alkyle contenant de 1 à 90 atomes de carbone et portant, le cas échéant, des substituants hydroxyle, carboxyle, carbonyle, amino, cyclopropyle ou méthoxyle ;

- X est un résidu aminoacyle du groupe comprenant :  
L-alanyle, L-arginyle, L-asparagyle, L-aspartyle,  
L-cystéinyle, L-glutaminyle, L-glutamyle, glycyle,  
L-histidyle, L-hydroxy-propyle, L-isoleucyle, L-leucyle,  
5 L-lysyle, L-méthionyle, L-phénylalanyle, L-propyle,  
L-séryle, L-thréonyle, L-tryptophanyle, L-tyrosyle et  
L-valyle, N-méthyl-L-alanine, et leurs formes D-;
- R<sub>7</sub> est un groupe -OH, -NH<sub>2</sub>, alcoylamide, alcoxy linéaire  
ou ramifié, aryle ou alcoxy-aryle comprenant au plus  
10 10 atomes de carbone,
- R<sub>8</sub> est un groupe -OH, -NH<sub>2</sub> ou un groupe alcoxy comprenant  
de 1 à 10 atomes de carbone,
- A représente un acide aminé tel qu'un résidu L-alanyle,  
lysine, L-glutamine et
- 15 - n est égal à 0,1 ou 2.

Avantageusement, on choisit le muramyl-peptide parmi ceux d'entre eux, notamment ceux répondant à la formule générale sus-indiquée, qui sont dépourvus de pyrogénicité, à des doses de 10 mg par kg chez le lapin, c'est-à-dire  
20 n'induisant pas un accroissement de température à 0,6°C à ces doses, dans les conditions décrites dans la Pharmacopée Européenne, volume II, pages 58-60, 1971.

Parmi ces substances préférées figurent ceux des composés dans lesquels R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub> sont simultanément un  
25 groupe hydroxyle, R<sub>7</sub> est un groupe alcoxy, linéaire ou ramifié comprenant au plus 10 atomes de carbone, X est un résidu L-alanyle.

Des composés particulièrement représentatifs de ces muramyl-peptides sont ceux qui sont constitués par les  
30 esters α-méthylique ou α-n-butylique déjà mentionnés de la N-acétyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamine.

A titre d'autres exemples de muramyl-peptides particulièrement intéressants, on rappelle encore la N-acétyl-muramyl-L-(-N-méthyl-alanyl)-D-isoglutamine qui a déjà été  
35 mentionnée.

Il est avantageux d'avoir recours à des compositions dans lesquelles le composé d'aluminium et le muramyl-peptide se trouvent dans un rapport pondéral de 0,05 à 1, par exemple de 0,4 (tel que 40 microgrammes du composé d'aluminium pour 100 microgrammes du muramyl-peptide).

L'invention concerne encore des compositions sous forme de doses unitaires contenant de 5 à 2000 microgrammes du composé d'aluminium et de 100 à 50.000 microgrammes du muramyl-peptide, notamment de 50 à 500 microgrammes du composé d'aluminium et de 100 à 10.000 microgrammes du muramyl-peptide, lorsque ladite composition est plus particulièrement destinée à l'homme.

Ces compositions peuvent être administrées seules lorsque l'on souhaite stimuler les défenses générales de l'organisme. Elles peuvent être administrées avec un vaccin. Dans ce dernier cas, elles peuvent faire l'objet d'administration distincte de celle du principe actif de vaccin dont l'effet immunogène doit être stimulé. L'invention peut cependant se présenter sous la forme d'une association des principes adjuvants sus-indiqués avec le principe actif de vaccin lui-même ou d'une association au conjugué antigène-muramyl-peptide.

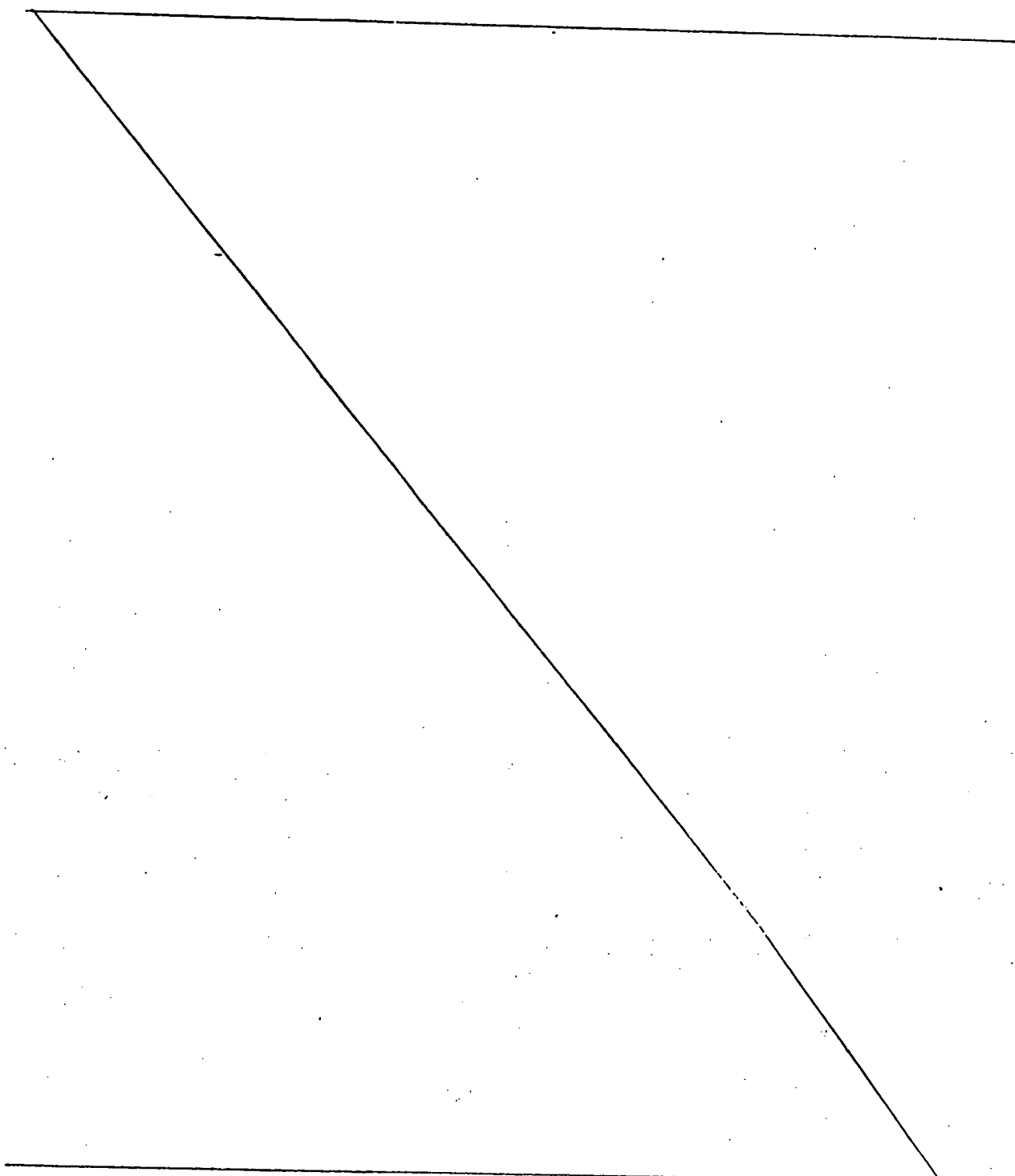
Un principe actif de vaccin préféré susceptible d'entrer dans ladite composition est constitué par des antigènes HBs purifiés.

Les compositions selon l'invention peuvent se présenter sous diverses formes, que ce soit sous forme de solution préconditionnée en vue de l'emploi, soit encore sous forme de mélange sec, le cas échéant lyophilisé, ces produits étant alors destinés à être remis en solution dans de l'eau stérile pour injection ou dans un sérum physiologique et isotonique.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit des conditions d'utilisation d'associations conformes à l'invention dans des essais effectués *in vivo* et démontrant

7

l'importance de la synergie susceptible d'être produite  
au niveau de l'activité, et en même temps la sélectivité  
de l'effet synergique se manifestant par une absence  
d'accroissement de l'induction des IgE par les organismes  
5 des hôtes.





### Principe général des expérimentations.

Les souris utilisées dans les expérimentations dont la description suit sont des BALB/c femelles âgées de 6 à 7 semaines et les cobayes des femelles Hartley de 400 g.

Le vaccin utilisé est une préparation hautement purifiée d'HBs du sous-type antigénique ay.

L'hydroxyde d'alumine est celui commercialisé sous la désignation "Alugel S" (Serva).

Les souris (6 par groupe) ont reçu, par voie sous-cutanée, 0,2 ml de tampon phosphate isotonique (PBS) contenant 5 µg ou 1 µg d'antigène seul ou associé avec les adjuvants dans des proportions qui seront indiquées plus loin. Dans certaines expériences, un rappel d'antigène seul, aux mêmes doses, est effectué après 3 semaines.

Les cobayes (5 par groupe) ont été immunisés suivant un protocole similaire avec 5 µg et 1 µg d'antigène.

Des prélèvements sanguins sont effectués à différents temps des réponses primaires et secondaires. Lors des saignées intermédiaires, chez la souris, les sérums sont groupés par lots, ils sont testés séparément après la dernière saignée.

Les dosages sont effectués par hémagglutination passive d'hématies humaines (groupe 0) sensibilisées par l'antigène HBs (Centre National de Transfusion Sanguine, Paris) selon les techniques décrites par G.N. VYAS et N.R. SHULMAN, Science, 170, 1970, p. 332 et D. BENAMON-DJIANE, Actualités transfusionnelles. Compte rendu du IXe Congrès National de Transfusion Sanguine, Nancy, 30-31 mai, 1-2 juin 1973.

1) Influence de l'hydroxyde d'aluminium et N-Ac-Mur-L-Ala-D-Gln-OnC<sub>4</sub>H<sub>9</sub> (encore désignés par l'abréviation "MDPG-butyl") administrés seuls respectivement, sur la réponse de la souris immunisée par l'antigène HBs.

Des expériences préliminaires faites chez la

souris avec 1  $\mu$ g d'antigène et 10, 100 ou 1000  $\mu$ g de mu-  
ramylpeptide ont montré que la dose de 100  $\mu$ g était la  
plus favorable. C'est pourquoi elle a été utilisée dans  
les expériences suivantes. Les doses d'hydroxyde d'alu-  
minium ont été soit de 40, soit de 200  $\mu$ g selon les cas  
5 évoqués ci-après. Dans une première série d'expériences,  
avec les adjuvants isolés (tableau I), on a eu recours  
aux protocoles expérimentaux suivants.

a. Les animaux (5 par lot) ont reçu, par la  
10 voie sous-cutanée, l'antigène avec ou sans adjuvant dans  
0,2 ml de PBS. Les réponses primaires ont été mesurées  
aux jours 14, 21 et 28 (J14, J21 et J28). Un rappel d'an-  
tigène seul, aux mêmes doses que lors de la première ad-  
ministration, a dans certains cas été effectué au jour 30.  
15 La réponse secondaire a été mesurée 14 jours après le  
rappel (J44).

b. Les sérums sont titrés par hémagglutination  
passive, les chiffres indiquent la plus grande dilution  
capable d'agglutiner les globules humains sensibilisés à  
20 l'antigène HBs.

c. Pour l'analyse statistique, le test t de  
Student a été utilisé. Les calculs sont effectués sur les  
Log<sub>2</sub> des titres d'hémagglutination passive. Les lots  
expérimentaux ont été comparés à leurs témoins respectifs.  
25

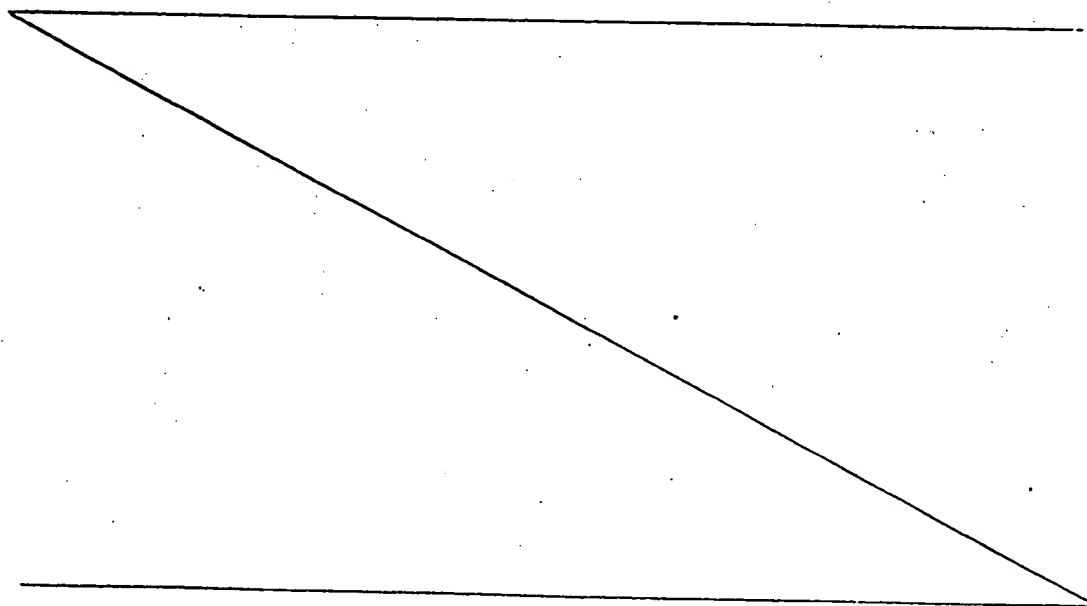


TABLEAU I. Influence de N-Ac-Mur-L-Ala-D-Gln-OnC<sub>4</sub>H<sub>9</sub> et de Al(OH)<sub>3</sub> sur la réponse de la souris immunisée par une faible dose d'antigène HBs.

Immunisation primaire		Titre d'héماغglutination			Rappel <sup>p</sup> J30	Réponse J44	
Antigène	Adjuvants MDPG-butyl   Al(OH) <sub>3</sub>	J14	J21	J28		Titres	Moyenne t de Student <sup>c</sup>
HBs 1 µg	-	} < 2	} < 2	} < 2	-	2,2,2 2,2,64	12
HBs 1 µg	-				HBs 1 µg	2,2,2 2,2,32	7
HBs 1 µg	100 µg	} < 2	} < 256	} < 256	-	64,128,128 128,128,512	180
HBs 1 µg	100 µg				HBs 1 µg	4096,8192,16384, 16384,32768,32768	p < 0,001
HBs 1 µg	-	} < 2	} < 128	} < 256	-	128,256,1024 1024,1024,1024	700
HBs 1 µg	40 µg				HBs 1 µg	16384,16384,32768 32768,32768,32768	p < 0,001
HBs 1 µg	40 µg						p < 0,001

Les résultats qui figurent sur le tableau I montrent qu'après injection de l'antigène seul, il n'y a qu'une faible élévation du taux des anticorps chez une souris sur six, et que la réinjection de l'antigène au 30ème jour ne modifie pas la réponse. Par contre, l'injection soit de 100 µg du muramylpeptide, soit de 40 µg d'Al(OH)<sub>3</sub> avec 1 µg d'HBs, augmente sensiblement la réponse primaire mesurée au 21ème et au 28ème jours après la première injection et même au 44ème jour chez les souris qui n'ont reçu l'antigène qu'une seule fois. On constate également que l'administration du muramylpeptide ou de l'adjuvant minéral a augmenté la réponse secondaire dans tous les cas où l'antigène HBs a été injecté au 30ème jour.

Des travaux similaires ont été effectués chez le cobaye. Ceux-ci ont reçu 1 et 5 µg d'antigène HBs associé à du MDPG-butyl. On constate que l'association de l'adjuvant à la forte dose d'antigène a produit une réponse primaire significativement plus élevée que chez les témoins. Avec la faible dose d'antigène, l'association du MDPG-butyl a permis d'obtenir en réponse primaire et secondaire des effets comparables à ceux observés avec la forte dose de l'antigène seul.

2) Influence de l'association de N-Ac-Mur-L-Ala-D-Gln-OnC<sub>4</sub>H<sub>9</sub> (MDPG-butyl) et d'hydroxyde d'aluminium sur la réponse de la souris immunisée par l'antigène HBs.

On a répété les expériences sus-indiquées en comparant l'effet du muramylpeptide administré seul ou en association avec 40 µg d'Al(OH)<sub>3</sub> sur la réponse à 1 µg d'antigène. Deux lots témoins ont été ajoutés correspondant à la dose utilisée en vaccination humaine, c'est-à-dire 5 µg d'HBs seuls ou associés à 200 µg d'Al(OH)<sub>3</sub>. Contrairement à l'expérience précédente, toutes les souris ont reçu deux injections d'antigène et ont été suivies pendant une période de 5 mois (150 jours), date à laquelle elles ont été saignées, et les sérums titrés individuellement. Ces résultats sont consignés sur le tableau II.

TABLEAU II. Activité des adjuvants seuls ou en association, à la souris immunisée par l'antigène HBs.

Immunisation <sup>a</sup>	Doses d'adjuvants		Réponses primaires <sup>b</sup>			Réponses secondaires <sup>b</sup>				
	NDPG-butyl	Al(OH) <sub>3</sub>	J 21	J 28	J 35	J 60	J 90	J 120	Titres séparés	J 150 Moyenne
1. HBs 5 µg	-	-	128	128	8192	4096	32768	8192	1024, 1024, 4096 16384, 65436, 130872	= 36000
2. HBs 5 µg	-	200 µg	128	256	32768	262144	262144	262144	8192, 16384, 32768 65436, 130872, 262144	= 86000
3. HBs 1 µg	-	-	< 2	< 2	128	128	4096	2048	2, 2, 2, 256, 512, 1024	= 300
4. HBs 1 µg	100 µg	-	128	128	2048	2048	8192	4096	1024, 1024, 1024, 2048, 2048, 32768	= 6600
5. HBs 1 µg	-	40 µg	512	128	1024	4096	4096	4096	1024, 2048, 2048, 4096, 4096, 8192	= 3600
6. HBs 1 µg	100 µg	40 µg	2048	4096	32768	524288	524288	65436	8192, 8192, 8192 8192, 32768, 130872	= 33000

a. Les souris (6 par groupe) ont reçu, par la voie sous-cutanée, 5 ou 1 µg d'HBs dans 0,2 ml associé aux adjuvants suivant les doses indiquées ci-dessus. Au jour 28, une injection de rappel d'antigène seul est effectuée à la même dose qu'en primaire.

b. Les sérums sont titrés par hémagglutination passive, les chiffres indiquent la plus grande dilution capable d'agglutiner les globules humains sensibilisés à l'antigène HBs.

On constate, à l'examen du tableau II que 1 µg d'antigène administré avec MDPG-butyl seul, induit des titres d'anticorps comparables à ceux observés avec 5 µg d'HBs administrés avec 200 µg d'Al(OH)<sub>3</sub> au cours de la  
5 réponse primaire, mais des titres beaucoup plus faibles au cours de la réponse secondaire. A la dose de 40 µg, l'hydroxyde d'aluminium induit une réponse primaire un peu plus élevée, cependant des réponses secondaires nettement plus faibles.

10 Par contre, on constate que l'association de 100 µg de muramylpeptide et de 40 µg d'Al(OH)<sub>3</sub> renforce considérablement les réponses tant primaires que secondaires de l'hôte. On observe de très fortes différences  
15 précoces et persistantes vis à vis des actions constatées chez les souris qui ont reçu l'antigène avec seulement l'un ou l'autre adjuvant. On remarque que chez les animaux qui ont reçu 1 µg de HBs et l'association des deux adjuvants, la réponse primaire est beaucoup plus élevée que celle de tous les autres groupes, y compris celui qui a  
20 reçu 5 µg d'antigène et 200 µg d'Al(OH)<sub>3</sub>. Ces différences qui témoignent donc d'un effet de synergie très important des actions des deux adjuvants, vont très au-delà de ce que représenterait le simple cumul des actions des deux adjuvants aux doses considérées.

25 3) Dissociation entre l'élévation du taux des anticorps totaux anti HBs et celle du taux des IgE spécifiques.

Les sérums de souris ont été réunis par lots et titrés par hémagglutination passive pour la mesure des  
30 anticorps totaux. Le dosage des IgE se fait par anaphylaxie cutanée passive. Les sérums sont dilués de 2 en 2 en tampon PBS. Ils sont injectés à des rats par la voie intradermique en différents points. Après 24 h (temps après lequel seuls les anticorps IgE restent fixés autour  
35 du point d'injection), on injecte par la voie veineuse l'antigène HBs mélangé à une concentration appropriée de

bleu Evans. Une demi-heure après l'injection, on repère la présence d'IgE au niveau des points d'injection par l'apparition d'une tâche bleue qui signale l'augmentation de perméabilité capillaire liée à la réaction IgE-HBs.

- 5 Les titres indiquent la plus forte dilution de sérum capable de provoquer une tâche (titre ACP, en ce qui concerne les IgE spécifiques).

10 Les résultats de ces test figurent dans le tableau III ci-après (dans lequel ont également été reportés à des fins de comparaison, les taux des anticorps totaux, exprimés en titres d'hémagglutinations, au 90ème jour, tels qu'ils figurent dans le tableau II ci-dessus):

TABLEAU III

15	<u>Immunisation</u>	Titre	Titre
		<u>Hémagglutination</u>	<u>ACP</u>
	HBs 1 µg	128	8
	HBs 1 µg + MDPG-butyl 100 µg	4096	64
	HBs 1 µg + Al(OH) <sub>3</sub> 40 µg	4096	124
20	HBs 1 µg + MDPG-butyl 100 µg Al(OH) <sub>3</sub> 40 µg	524254	124
	HBs 5 µg + Al(OH) <sub>3</sub> 200 µg	262144	>1000

- 25 Les résultats témoignent par conséquent d'une absence totale de potentialisation, voire même d'une répression de l'action des IgE induits, par rapport au cumul des inductions observées dans les groupes de souris ayant reçu les adjuvants isolés.

30 L'importance de ce résultat s'apprécie aussi au vu de l'accroissement du taux des IgE considérablement plus élevé qui est mesuré chez les souris qui ont reçu 5 µg d'antigène associés à 200 µg d'Al(OH)<sub>3</sub> pour obtenir au jour 90 une réponse secondaire, en anticorps totaux, qui n'est que la moitié de celle observée avec l'associa-  
35 tion.

Il va naturellement de soi que l'utilisation de la composition adjuvante selon l'invention n'est pas limitée à la constitution de vaccins contenant, à titre de principe actif, un antigène HBs ou tout agent immuno-  
5 gène apte à induire la production d'anticorps actifs contre le virus de l'hépatite virale B. Elle peut aussi être utilisée pour stimuler les réactions immunitaires de l'organisme de l'hôte contre tout principe actif de vaccin, qu'il s'agisse d'anatoxines, de vaccins pu-  
10 rifiés obtenus à partir des agents pathogènes à l'égard desquels une vaccination est recherchée.

L'invention s'applique encore à la constitution de compositions vaccinales, dans lesquelles l'agent immunogène est constitué par un haptène rendu immunogène  
15 par fixation sur une molécule porteuse. Entrent évidemment dans le cadre des applications de l'invention celles mettant en jeu des principes actifs de vaccins entièrement synthétiques.

De préférence, les compositions selon l'invention comportent en outre des véhicules appropriés permettant leur administration par voie parentérale ou la préparation extemporanée de solutions injectables, notamment par dissolution ou suspension dans un soluté injectable. Les susdites compositions contiennent éventuellement éga-  
25 lement le principe actif du vaccin.

L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques administrables par d'autres voies, notamment par voie orale ou rectale, ou encore sous forme d'aérosols destinés à venir en contact avec des muqueuses,  
30 notamment les muqueuses oculaires, nasales, pulmonaires ou vaginales.

En conséquence, elle concerne des compositions pharmaceutiques dans lesquelles les principes adjuvants selon l'invention se trouvent associés à des excipients  
35 pharmaceutiquement acceptables, solides ou liquides, adaptés à la constitution de formes orale, oculaire ou



nasale, ou avec des excipients adaptés à la constitution de formes d'administration rectale, ou encore avec des excipients gélatineux pour l'administration vaginale. Elle concerne aussi des compositions liquides isotoniques  
5 contenant l'un au moins des produits selon l'invention, adaptés à l'administration sur les muqueuses, notamment oculaire ou nasale. Elle concerne enfin des compositions formées de gaz liquéfiés pharmaceutiquement acceptables, du type propulseur, dans lesquelles les produits selon  
10 l'invention sont dissous ou maintenus en suspension, et dont la détente provoque la dispersion en un aérosol.

Comme il va de soi, et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne limite nullement à ceux de ses modes d'application et de réalisation  
15 tion qui ont été plus particulièrement envisagés ; elle en embrasse, au contraire, toutes les variantes.

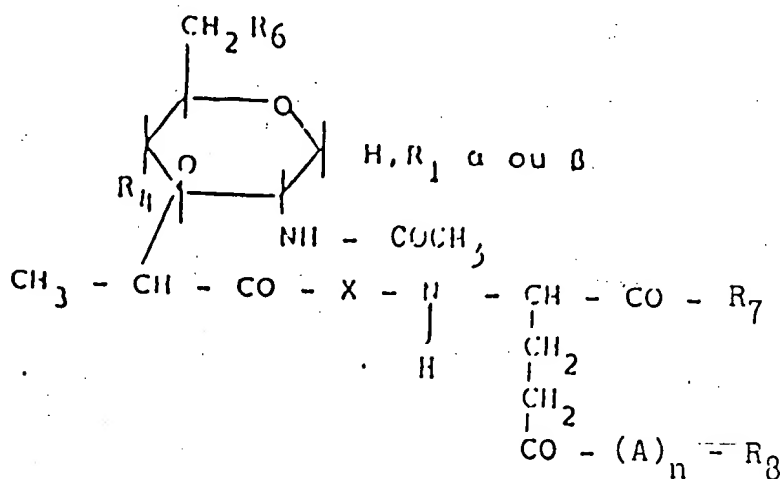
REVENDEICATIONS

1. Composition caractérisée par l'association de dérivés d'aluminium, avec au moins un muramyl-peptide, dans des proportions mutuelles permettant l'exaltation de leurs propriétés adjuvantes mutuelles au-delà de l'activité qui résulterait du simple cumul des activités propres de chacun des constituants de ladite composition.

2. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que le susdit dérivé d'aluminium est constitué par l'hydroxyde d'aluminium.

3. Composition selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que l'on choisit le muramyl-peptide parmi ceux d'entre eux qui sont dépourvus de pyrogénicité, à des doses de 10 mg par kg chez le lapin, c'est-à-dire n'induisant pas un accroissement de température à 0,6°C à ces doses, dans les conditions décrites dans la Pharmacopée Européenne, volume II, pages 58-60, 1971.

4. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le muramyl-peptide répond à la formule générale :



dans laquelle les substituants  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_6$ ,  $\text{X}$ ,  $\text{R}_7$ ,  $\text{R}_8$ ,  $\text{A}$  et  $n$  ont respectivement les significations suivantes :

13

- $R_1$  est  $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-NY$  ou  $-OY$ ,  $Y$  représentant un groupe substitué ou non par un groupe amino, ce groupe étant choisi parmi alcoyle, aryle ou alcoyl-aryle portant un maximum de 10 atomes de carbone ;
- 5 -  $R_4$  est hydroxyle, acyloxy ou alcoxy ayant au plus 4 atomes de carbone, ou monosuccinyle ;
- $R_6$  est  $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-NHZ$  ou  $-OZ$ ,  $Z$  étant un radical linéaire ou ramifié formé par acyle ou alkyle contenant de 1 à 90 atomes de carbone et portant, le cas échéant,  
10 des substituants hydroxyle, carboxyle, carbonyle, amino, cyclopropyle ou méthoxyle ;
- $X$  est un résidu aminoacyle du groupe comprenant :  
L-alanyle, L-arginyle, L-asparagyle, L-aspartyle,  
L-cystéinyle, L-glutaminyle, L-glutamyle, glycyle,  
15 L-histidyle, L-hydroxy-propyle, L-isoleucyle, L-leucyle, L-lysyle, L-méthionyle, L-phénylalanyle, L-propyle, L-séryle, L-thréonyle, L-tryptophanyle, L-tyrosyle et L-valyle, N-méthyl-L-alanine, et leurs formes D-;
- $R_7$  est un groupe  $-OH$ ,  $-NH_2$ , alcoylamide, alcoxy linéaire  
20 ou ramifié, aryle ou alcoxy-aryle comprenant au plus 10 atomes de carbone,
- $R_8$  est un groupe  $-OH$ ,  $-NH_2$  ou un groupe alcoxy comprenant de 1 à 10 atomes de carbone,
- $A$  représente un acide aminé tel qu'un résidu L-alanyle,  
25 lysine, L-glutamine et
- $n$  est égal à 0, 1 ou 2.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le composé d'aluminium et le muramyl-peptide se trouvent dans un  
30 rapport pondéral de 0,005 à 1, notamment de 0,4.

6. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle se trouve sous forme de doses unitaires contenant de 5 à 2.000 microgrammes du composé d'aluminium et de 100 à 50.000  
35 microgrammes du muramyl-peptide.

5 7. Composition selon la revendication 6, plus particulièrement destinée à l'homme, caractérisée en ce qu'elle se trouve sous forme de dose unitaire contenant de 50 à 500 microgrammes du composé d'aluminium et de 100 à 10.000 microgrammes du muramyl-peptide.

10 8. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une association d'hydroxyde d'alumine et de l'ester  $\alpha$ -n-butylique de la N-acétyl-muramyl-L-alanyl-D-glutamine.

9. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle contient en outre un principe actif du vaccin.

15 10. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce que le vaccin est constitué par un antigène HBs ou un agent immunogène apte à induire la production d'anticorps actifs contre le virus de l'hépatite virale B.